

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/004301

International filing date: 11 March 2005 (11.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP  
Number: 2004-069835  
Filing date: 11 March 2004 (11.03.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 12 May 2005 (12.05.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

14. 3. 2005

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application: 2 0 0 4 年 3 月 1 1 日

出 願 番 号  
Application Number: 特 願 2 0 0 4 - 0 6 9 8 3 5

パリ条約による外国への出願  
に用いる優先権の主張の基礎  
となる出願の国コードと出願  
番号

The country code and number  
of your priority application,  
to be used for filing abroad  
under the Paris Convention, is

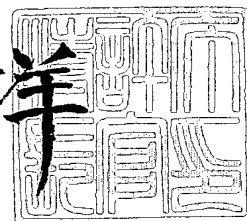
J P 2 0 0 4 - 0 6 9 8 3 5

出 願 人  
Applicant(s): 学 校 法 人 久 留 米 大 学

2 0 0 5 年 4 月 2 0 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小 川 洋



【書類名】 特許願  
【整理番号】 P04AC002  
【あて先】 特許庁長官 殿  
【国際特許分類】 A01K 67/00  
G01N 33/15  
A61K 45/00

【発明者】  
【住所又は居所】 福岡県筑紫野市美しが丘南 1 - 8 - 7  
【氏名】 星野 友昭

【特許出願人】  
【識別番号】 599045903  
【氏名又は名称】 学校法人 久留米大学

【代理人】  
【識別番号】 100113044  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 木島 智子

【手数料の表示】  
【予納台帳番号】 175973  
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】  
【物件名】 特許請求の範囲 1  
【物件名】 明細書 1  
【物件名】 図面 1  
【物件名】 要約書 1

**【書類名】 特許請求の範囲****【請求項 1】**

肺特異的に発現するプロモーターの制御下にあるインターロイキン-18 遺伝子を含むことを特徴とする組換遺伝子。

**【請求項 2】**

肺特異的に発現するプロモーターが、肺構成細胞由来プロモーターである、請求項 1 記載の組換遺伝子。

**【請求項 3】**

請求項 1 又は 2 の組換遺伝子を導入した疾患動物モデル。

**【請求項 4】**

疾患が、肺疾患及び／又は循環器疾患であることを特徴とする請求項 3 記載の疾患動物モデル。

**【請求項 5】**

疾患が慢性閉塞性肺疾患、肺胞蛋白症、間質性肺炎、循環不全から選択される少なくとも一種以上であることを特徴とする、請求項 4 記載の動物疾患モデル。

**【請求項 6】**

肺特異的に発現するプロモーターが、肺構成細胞由来プロモーターである、請求項 3 乃至 5 のいずれかに記載の疾患動物モデル。

**【請求項 7】**

請求項 3 乃至 6 のいずれかの疾患動物モデルを用いることを特徴とする、被験物の疾患に与える影響を評価する方法。

**【請求項 8】**

評価目的が、疾患の予防又は治療剤のスクリーニングであることを特徴とする、請求項 7 に記載の評価方法。

**【請求項 9】**

IL-18 阻害剤、レドックス活性蛋白質、又はこれらをコードする遺伝子から選択される、少なくとも一種以上を含むことを特徴とする、慢性閉塞性肺疾患の予防又は治療剤。

**【請求項 10】**

IL-18 阻害剤、レドックス活性蛋白質、又はこれらをコードする遺伝子から選択される、少なくとも一種以上を含むことを特徴とする、肺胞蛋白症の予防又は治療剤。

**【請求項 11】**

IL-18 阻害剤、レドックス活性蛋白質、又はこれらをコードする遺伝子から選択される、少なくとも一種以上を含むことを特徴とする、循環器疾患の予防又は治療剤。

## 【書類名】明細書

【発明の名称】組換え遺伝子、疾患動物モデル、及び被験物の評価方法並びに疾患予防・治療剤

## 【技術分野】

## 【0 0 0 1】

本発明は、慢性閉塞性肺疾患や肺胞蛋白症、間質性肺炎等の肺疾患、又は心不全・肝不全等の循環不全に代表される循環器疾患を発症する動物モデル及びその利用等に関するものである。

## 【背景技術】

## 【0 0 0 2】

慢性閉塞性肺疾患Chronic Obstructive Pulmonary Disease: (以下、「COPD」と記載する。)とは、肺気腫、慢性気管支炎、あるいは両者の併存により、進行性の閉塞性換気障害を特徴とする疾患である。COPDにおける気流制限は、末梢気道病変における気道抵抗上昇と肺気腫による肺弾性収縮力低下に因り、2者の関与の程度は症例によって様々ではあるが、本邦のCOPD患者の多くは肺気腫優位の傾向を示す。肺気腫の最大のリスクファクターが喫煙である事は多くの疫学的研究より明らかである。2001年に米国National Heart, Lung and Blood Institution (NHLBI)とWorld Health Organization (WHO)との共同で報告されたGlobal Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD)にも述べてあるように、1990年の調査では世界でのCOPDの罹患率は男性で9.34/1000, また女性では7.33/1000となっており、罹患率が非常に高い疾患である。現時点でのCOPDによる呼吸不全が原因の死亡は、アメリカの死因の4位と推定されている。また、日本における厚生労働省の報告でもCOPDによる死亡率は、最近の30年間で約4倍に増加した。COPD治療薬として従来知られているのは、気管支拡張剤とステロイドもしくはこの組み合わせである。しかしながらあまり効果がなく、新規の治療薬が求められている。

## 【0 0 0 3】

また、肺胞蛋白症とは肺胞腔内にサーファクタント蛋白とリン資質が集積する原因不明の疾患である。近年、90%を占める特発例でGM-CSFの活性を抑制する自己抗体の存在が示されたが、現在のところ根治的治療法がなく、気管支鏡下で肺胞を洗浄するぐらいしか治療法はない。

## 【0 0 0 4】

これらの疾病のより有効な治療薬の探索のために、動物モデルの利用が考えられるが、これまでに樹立された動物モデル系は、満足のいくものではなかった。

## 【0 0 0 5】

例えば、COPDの一種である肺気腫の動物モデルとしては、下記のようなものが古くから知られている。

(I) タバコを毎日12時間かつ6ヶ月以上喫煙させて作製する喫煙モデル

(II) 気管内へエラスターゼやパパイニン等を投与した動物モデル

## 【0 0 0 6】

しかしながら(I)の喫煙モデルはその作製に時間と手間がかかりすぎる。また(II)の気管内へのエラスターゼやパパイニン等の投与は、手技的に困難であり、かつ大量のエラスターゼやパパイニンを動物気管内に投与するため、病理学的には実験肺気腫が出来るが、果たしてどれだけヒトのCOPDに近いかが疑問が残る。

## 【0 0 0 7】

そのためこれら古典的COPD及び肺気腫の動物モデルは世界中でほとんど使われていない。

## 【0 0 0 8】

我々はCOPDを研究するにあたって、まず豚脾臓エラスターゼをシリンジでマウス気管内投与する古典的COPDマウスモデルを作製し、評価した。その結果、病理学的には実験肺気腫が出来たが、以下の問題点があったため確認された。

## 【0 0 0 9】

- (1) 手技的に困難でかつ比較的大量のエラスターゼが必要。
- (2) 実験で利用できるエラスターゼ用量の幅が狭い。つまり多すぎるとマウスが死亡し、少なすぎると肺気腫が出来ない。
- (3) 両側全肺区域に亘る、びまん性の肺気腫ができない。つまりヒトCOPDと異なる可能性がある。
- (4) 個々のマウスにおいて、実験肺気腫形成に差があり、投与試料の治療効果の比較評価が困難。

#### 【0010】

最近になって、Yale大学のEliasらによって、IFN- $\gamma$  トランスジェニックマウス（以下、「TGマウス」と記載する。）が、テトラサイクリン誘導体（DOX）投与によってIFN- $\gamma$  を誘導し肺気腫を誘導することが報告された。

#### 【0011】

また同様にテトラサイクリン誘導体投与（DOX）で肺特異的にIL-13を発現させることによっても、肺気腫が誘導された。

#### 【0012】

しかしながら、これらの肺気腫誘導法は、いずれもテトラサイクリン誘導体（DOX）という抗生物質の投与を必要とするため、作製が煩雑かつ高価であり、また利用に際し、他の予期せぬ症状を併発する可能性もあること等から、マウスモデルとしては、適当とは言えない。

#### 【0013】

また、TNF- $\alpha$  TGマウスも肺気腫を誘導することが報告されているが、このマウスにおける肺気腫誘導はあまり強いものではないため、実用レベルには達していないものと考えられる。

【非特許文献1】 Wang Z, Zheng T, Zhu Z, Homer RJ, Riese RJ, Chapman HA, Jr., Shapiro SD, Elias JA., " Interferon gamma induction of pulmonary emphysema in the adult murine lung." The Journal of Experimental Medicine, 2000年, 192号, P.1587-1600

【非特許文献2】 Lanone S, Zheng T, Zhu Z, Liu W, Lee CG, Ma B, Chen Q, Homer RJ, Wang J, Rabach LA, Rabach ME, Shipley JM, Shapiro SD, Senior RM, Elias JA., "Overlapping and enzyme-specific contributions of matrix metalloproteinases-9 and -12 in IL-13-induced inflammation and remodeling." The Journal of Clinical Investigation 2002年, 110号, P.463-474

#### 【0014】

一方、間質性肺炎、肺胞蛋白症、循環不全（肝不全、心不全等）に至っては、良い動物モデルがほとんどないのが現状である。

#### 【0015】

このため、COPD肺炎、肺胞蛋白症、循環不全（肝不全、心不全等）の根治的治療薬及び治療法はいまのところ確立されていない。

#### 【発明の開示】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0016】

本発明者等は、本発明に先立って、IL-18TGマウスを世界で初めて樹立し（J. Immunology, 2001）、またヒトkeratinocyte promoter (K5)を用いた皮膚特異的発現IL-18TGマウスが皮膚炎を発症することを見出している（J. Investigative Dermatology 2003）。そして、これら一連の研究の中で見出した、IL-18がIFN- $\gamma$  産生を誘導し、またTh2サイトカイン（IL-4, IL-5, IL-13etc）をも誘導する点に着目し、Eliasらの報告と考え合わせた結果、IL-18のCOPD等への関与の可能性に思い至り、鋭意研究を重ねた。

#### 【0017】

その結果、以下のことを見出し、本発明に到達したものである。

つまり、肺気腫の発症に、より直接的に関与していると思われていたIFN- $\gamma$  やIL-13でさ

え、その肺気腫発症には抗生物質であるテトラサイクリンを必要としたのに対し、IFN- $\gamma$ やIL-13発生の起因物質であるIL-18の場合、肺気腫誘導の流れからは、より遠ざかっていると思われるにも拘わらず、抗生物質を用いることなく肺気腫等を引き起こしうることを、また、その肺気腫等の発症が、TNF- $\alpha$  TGによる場合よりも、強く現れる傾向にあることを見出したのである。しかも、本発明にかかる動物モデルは、上述したエラストーゼを用いる古典的COPD・肺気腫動物モデルの場合と違って、両側全肺区域に亘る、びまん性の肺気腫が個体差無く発生する傾向があり、ヒトCOPDにより近い動物モデルであることを見出した。同時に、本発明にかかる動物モデルは慢性の呼吸不全が原因による心不全を伴う循環不全を併発していた。我々が知る限り慢性の呼吸不全が原因による心不全を伴う循環不全を併発した動物モデルは未だ報告されていない。その上、古典的エラストーゼを用いる古典的COPD・肺気腫動物モデルは異物である豚エラストーゼやパパインを用いる。一方、本発明にかかる動物モデルは生理活性物質IL-18を発現するので、より人のCOPD・肺気腫に近いと考えられる。

#### 【0018】

従って、その目的とするところは、COPD、間質性肺炎、肺胞蛋白症等の肺疾患、循環不全（肝不全、心不全等）等の循環器疾患等の、実用レベルに達した動物モデルを提供すること、及びその動物モデルを用いたこれら疾病の治療薬の評価方法を確立すること、更にはこの評価方法を用いて、これら疾病の治療薬を提供することにある。

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0019】

上述の目的は、（１）肺特異的に発現するプロモーターの制御下にあるインターロイキン-18遺伝子を含むことを特徴とする組換遺伝子、肺特異的に発現するプロモーターが、肺構成細胞由来プロモーターである、当該組換遺伝子、（２）当該組換遺伝子を導入した疾患動物モデル、疾患が、肺疾患及び／又は循環器疾患であることを特徴とする当該疾患動物モデル、疾患が慢性閉塞性肺疾患、肺胞蛋白症、間質性肺炎、循環不全から選択される少なくとも一種以上であることを特徴とする、当該動物疾患モデル、肺特異的に発現するプロモーターが、肺構成細胞由来プロモーターである当該疾患動物モデル、（３）上記のいずれかの疾患動物モデルを用いることを特徴とする、被験物の疾患に与える影響を評価する方法、評価目的が、疾患の予防又は治療剤のスクリーニングであることを特徴とする、当該評価方法、及び（４）IL-18阻害剤、レドックス活性蛋白質、又はこれらをコードする遺伝子から選択される、少なくとも一種以上を含むことを特徴とする、慢性閉塞性肺疾患や肺胞蛋白症患者治療剤、循環器疾患等の予防又は治療剤によって、達成される。

#### 【発明の効果】

#### 【0020】

本発明の組換遺伝子を発現させた動物モデルを用いることによって、従来、起炎物となるタバコの繰り返し投与のために６ヶ月に亘る長期間を要していた、COPDや肺気腫等の慢性閉塞性肺疾患、肺胞蛋白症、間質性肺炎等の肺疾患、循環不全（肝不全、心不全）等の循環器疾患に対する被験物の評価が、生後約５週間という短期間で、しかも起炎物の投与を一切行わないで簡便に行うことができる。

#### 【0021】

また、本発明の、COPD、間質性肺炎、肺胞蛋白症等の肺疾患や、循環不全（肝不全、心不全等）等の循環器疾患の予防又は治療剤によって、呼吸器、循環器障害全般、これらの中でも、特にIL-18の過剰発現に起因するものを、有効に治療・予防することができる。

#### 【0022】

更に、本発明のモデル動物によって、呼吸器、循環器障害の予防・治療剤のスクリーニングが可能となり、また被験物の呼吸器、循環器障害に与える影響を調べる（いわゆる二次スクリーニング）ことができる。

#### 【発明を実施するための最良の形態】

#### 【0023】

〈組換遺伝子〉

本発明の遺伝子は、IL-18遺伝子を、肺特異的に発現するプロモーターの制御下に置くことによって、得ることができる。肺特異的に発現するプロモーターとしては、肺構成細胞由来プロモーター等が挙げられ、例えば肺サーファクタントプロモーター又はクララ細胞プロモーター等が挙げられる。

肺サーファクタントプロモーターとしては、ヒト肺サーファクタントプロモーター (surfactant protein-C遺伝子プロモーター。以下、SPCプロモーターと記載する。) 等が挙げられ、クララ細胞プロモーターとしては、CC10プロモーター (CCSPと言うことがある。) 等が挙げられる。

これらを用いることで、本発明の疾病動物モデルを効率良く作成することができる。

#### 【0024】

組換え遺伝子は、このほか、導入遺伝子の細胞外への放出を促進するためのシグナルペプチド (SP) 遺伝子や、コザック配列等のタンパク発現を最適化する作用を持つ配列、発現遺伝子の釣り出し等に有用なポリ A 配列等を含んでいることが好ましい。

#### 【0025】

シグナルペプチドとしては、例えばマウスの免疫グロブリン (以下Igと記載する。)  $\kappa$  - チェーン・シグナルペプチド等が挙げられる。

#### 【0026】

ポリ A 配列としては、牛由来のポリ A 配列等が挙げられる。

#### 【0027】

また、導入遺伝子の細胞外への放出を促進するためには、シグナルペプチド遺伝子の導入のほか、プロIL-18を成熟型IL-18に変換するIL-1 $\beta$ 変換酵素 (カスパーゼ-1) 遺伝子を、IL-18遺伝子とともに動物モデルに導入し、共に発現させる方法等、他の公知の技術を用いることもできる。

#### 【0028】

〈疾患動物モデル〉

本発明の疾病動物モデルは、例えば次のような方法で、作成することができる。

#### 【0029】

本発明に使用されるげっ歯類動物としてはマウス、ラット等が挙げられるが、マウスが好ましく、マウスは、例えば、C57BL/6Nマウス (B6マウス)、Balb/cマウス等が好ましく用いられ、中でも、B6マウスが好ましい。

#### 【0030】

げっ歯類に導入する組換え遺伝子は、肺特異的に発現するプロモーター及びその制御下にあるIL-18遺伝子を含むものである。以下本発明の説明においては、おもに、導入げっ歯類がマウスの場合を例に挙げて説明することがあるが、本発明は、マウスに関するものに限定されるものではない。

#### 【0031】

上記を含む組換え遺伝子の作出方法としては、遺伝子組み換えの公知の方法を用いることができるが、例示すると、以下の通りである。

#### 【0032】

マウスIg $\kappa$  - チェーンの、V-J2-C領域から取り出したシグナルペプチドと、マウスのpro-IL-18 cDNAを用い、シグナルペプチドを持つ成熟IL-18 cDNAを、PCR法によって取得する。シークエンス (DNA配列) を図1及び配列1に例示する。図1 (配列1) の配列中、7~9番目にある開始コドン「ATG」の直後の、10番目の配列Gから、69番目の配列Cまでが、マウスIg $\kappa$  鎖のV-J2-C領域由来シグナルペプチド遺伝子、その直後の「AAC」コドンから541~543番目の「TAG」STOPコドンの直前の「AGT」コドンまでが、マウスの成熟IL-18 cDNAである。

#### 【0033】

尚、開始コドンの前の、「GGA ACA」は、元々マウスのpro-IL-18 cDNAのゲノムにあった、コザック配列を含む、タンパク発現を最適化する配列領域である。

#### 【0034】



また、STOPコドンの後の「GTG」は、元々マウスのpro-IL-18 cDNAのゲノムにあった配列であるが、特に必要ではないと考えられる。

#### 【0035】

次に、pCR2.1ベクターを用いてPCR産物をクローニングし、シーケンスする。続いてヒトサーファクタントのプロモーターSPC、SV40 small T intronと牛由来ポリAを含む3.7S PC/SV40ベクターで、サブクローニングされ、SPC-IL-18SPとする（図2）。

#### 【0036】

SPC-IL-18SP をNdeIとNotIの制限酵素部位で切断することによって、直鎖状DNAフラグメントを得ることができる。

#### 【0037】

組換え遺伝子をマウスに導入する方法としては、公知の遺伝子導入方法を用いることができるが、例えば、マウスの受精卵に上述のようにして得られた組換え遺伝子を注入し作製したSPC-IL-18TGマウス(founder)を、野生型のマウスと掛け合わせ、その子孫のうち、IL-18を発現しているものを選別することで、行うことができる。選別する方法としては、尻尾のゲノムDNAを用いたPCR分析、血清中の成熟IL-18のELISA分析、肺や心臓、肝臓等における、成熟IL-18のウェスタンブロッティング分析等が挙げられる。

#### 【0038】

本発明に用いられる肺特異的に発現するプロモーターの制御下にあるインターロイキン-18遺伝子（以下、IL-18と記載することがある。）の導入量は、マウスの種類や発症させたいタイミング、発症させたい程度等にて合わせて、適宜調節することができ、特に限定されるものではないが、一般的には、肺で1 ng/lung以上と考えられる。

モデル動物におけるIL-18発現が、例えば血清中の成熟IL-18のELISA分析で1 ng/mLとなる程度に導入することが好ましい。導入量が多いほど、本発明で標的とする肺疾患や循環器疾患の殆どが発症する傾向にある。

#### 【0039】

SPC-IL-18導入から発症までの時期は、特に限定されるものではないが、早ければ4週齢前後から発症し始め、5週齢前後で殆どが発症し、高齢になるほど強い症状が現れる傾向にある。早い段階では、発症する疾病の種類やその出方に差があるが、5週齢前後で、本発明の肺疾患や循環器疾患の殆どが発症する傾向にある。

#### 【0040】

上記のようにして得られた本発明の疾病動物モデルは、慢性閉塞性肺疾患、肺胞蛋白症、間質性肺炎等の肺疾患や、心不全、肝不全等の循環不全を含む、循環器疾患モデルとして有用である。また、肺特異的プロモーターを使用した本発明の動物モデルが、肺だけではなく、心不全等のモデルとしても使用できることから、本動物モデルは、肺疾患に限らず、疾患の動物モデルとして広く利用できることが確認された。

#### 【0041】

〈本発明の評価方法〉

以下に説明する本発明の「被験物の評価方法」とは、主に評価目的がスクリーニングであるものが挙げられるが、本発明で言うスクリーニングには、複数候補の中から、目的の予防又は治療剤等を選択するための、いわゆる一次スクリーニングの他、被験物の予防又は治療効果を確認するための、二次スクリーニング（確認試験）も、含まれる。従って、公知のCOPD治療剤（気管支拡張剤、ステロイドもしくはこの組み合わせ等）の効果を確認するため、あるいは、他の一次スクリーニング方法によって得られたCOPD治療剤の治療効果の確認にも用いることができる。なぜなら、本発明の動物モデルは、びまん性の肺気腫ができ、古典的な動物モデルよりも、ヒトCOPDにより近くスクリーニングにかかる時間が4-6週間前後と短いため、公知のCOPD治療剤等について再評価する際にも有用だからである。

#### 【0042】

〈本発明のCOPD、間質性肺炎、肺胞蛋白症、循環不全（肝不全、心不全）の、予防又は治療剤〉

本発明の疾患の予防又は治療剤として用いられるものとしては、IL-18阻害剤、レドックス活性蛋白質、又はこれらをコードする遺伝子等が挙げられる。

【0043】

IL-18阻害剤としては、IL-1 $\beta$ 変換酵素阻害剤を含むシステインプロテアーゼ阻害剤等の、IL-18前駆体から活性型IL-18への変換を阻害する物質、IL-18結合蛋白質 (IL-18 binding protein (IL-18BP) グループ等) や抗IL-18抗体等の、IL-18の活性を中和する物質、可溶性IL-18レセプター (特願2003-282375) 等のIL-18受容体へのIL-18の結合を阻害する物質、IL-18受容体結合後のシグナル伝達の阻害剤等、又はこれらをコードする遺伝子等が挙げられる。

【0044】

IL-1 $\beta$ 変換酵素阻害剤としては、種々の化合物が知られており、具体例として、例えば、公開特許公報平5-255218号公報に記載のペプチド誘導体、公開特許公報平11-147873号公報に記載のスルホンアミド誘導体、公表特許公報平10-504285号公報に記載のペプチド誘導体、公開特許公報平11-147895号公報に記載のグリシン誘導体および国際出願WO97/24339号公報に記載のテトラゾール誘導体等が挙げられる。

【0045】

IL-18結合蛋白質 (IL-18BP) は、文献[Immunity, 10, 127-136(1999)]に記載の方法に準じて調製することができる。

【0046】

IL-18に特異的なモノクローナル抗体は、文献[J. Immunol. Methods, 217, 97-102(1998)]に記載の方法に準じて調製することができる。

【0047】

IL-18受容体へのIL-18の結合を阻害する物質の具体例としては、例えば、IL-18受容体蛋白質およびIL-18の受容体に特異的なモノクローナル抗体等を挙げることができる。IL-18の受容体に特異的なモノクローナル抗体としては、H44モノクローナル抗体 (Human IL-18 R ( $\alpha$  chain) に対する抗体) 等が挙げられる。

【0048】

上記IL-18の受容体に特異的なモノクローナル抗体は、哺乳動物由来の抗体、キメラ抗体又は擬人化抗体のいずれであっても良い。

【0049】

本発明に用いられるIL-18受容体蛋白質およびIL-18の受容体に特異的なモノクローナル抗体は、例えば、特開平11-100400号公報に記載の方法に準じて調製することができる。

【0050】

レドックス活性蛋白質とは、レドックス (酸化と還元, reduction-oxidation) の両方の活性を有することによって、レドックス制御 (酸化還元状態を調節すること) のできる蛋白質であり、レドックス活性ペプチド等をも含むものである。例えば、チオレドキシンファミリーに属するポリペプチド類や、HO-1 (ヘムオキシゲナーゼ-1) 等が挙げられる。

【0051】

チオレドキシンファミリーに属するポリペプチド類とは、チオレドキシン (以下「TRX」と記載する。) ファミリーに属するポリペプチド類 (以下、「TRX-P」と記載する。) とは、ジチオール結合やジスルフィド結合の酸化還元活性を有するポリペプチド類であって、もともと、生物細胞中に存在するポリペプチド類である (特開2002-179588等参照)。

【0052】

本発明で言う「TRX-P」には、天然のヒトを含む動物、植物、大腸菌、酵母からの抽出ポリペプチド類以外に、遺伝子組み換えにより酵母や大腸菌等から抽出されるポリペプチド類、化学合成で作成されるポリペプチド類等も含まれる。

【0053】

但し、ヒト由来のもの、及びそれを大腸菌、酵母において遺伝子組み換えで作成したもの、及びそれらと同一又は類似の配列からなる合成ペプチドが、生体に与える影響がより少ないと考えられるため好ましい。

**【0054】**

チオレドキシシンファミリーに属するポリペプチドは、システイン残基を含む活性部位(—Cys—X1—X2—Cys—:X1, X2は、アミノ酸残基を表し、同一であっても異なるものでも良い。)を有し、類似の3次元構造を持つ分子群である。

**【0055】**

従って、本発明で言う「TRX-P」には、上記の他、ジチオール結合やジスルフィド結合の酸化還元活性を損なわない範囲で、一部のアミノ酸が欠失又は置換されたものや、他のアミノ酸、ペプチドが融合されたものであっても良い。

**【0056】**

活性部位の具体例としては、—Cys—Gly—Pro—Cys—, —Cys—Pro—Tyr—Cys—, —Cys—Pro—His—Cys—, —Cys—Pro—Pro—Cys—等が挙げられるが、中でも、—Cys—Gly—Pro—Cys—が、種を超えて保存されている配列であるため、マウスモデルによる実験結果の人間への応用がより確実であるという理由で好ましい。

**【0057】**

「TRX-P」には、具体的には、例えば、活性部位が—Cys—Gly—Pro—Cys—であるチオレドキシシン、グルタレドキシシン等が挙げられる。

**【0058】**

チオレドキシシンには、ヒト、大腸菌、酵母由来のものがあり、グルタレドキシシンには、ヒト、大腸菌由来のものがある。

**【0059】**

ヒト細胞から「TRX-P」を抽出する具体的な方法としては、以下の方法が例示される。

- (A) ヒト由来の細胞株から抽出する方法(特開平1-85097号公報等参照)。
- (B) 遺伝子組み換え法を用いる方法(特開平1-85097号公報等参照)。
- (C) ペプチド合成法を用いる(特開平5-139992号公報等参照)。

**【0060】**

本発明の予防又は治療剤中の有効成分の含有量は、剤形によって様々であり、一概に限定できず、各種剤形化が可能な範囲で、投与量との関係で適宜選択すれば良いが、例えば液剤の場合、0.0001~10(w/v%), 好ましくは0.001~5(w/v%), 特に注射剤の場合、0.0002~0.2(w/v%), 好ましくは0.001~0.1(w/v%), 固形剤の場合、0.01~50(w/v%), 好ましくは0.02~20(w/v%)等として調製できるが、必ずしもこの範囲に限定されるものではない。

**【0061】**

本発明の呼吸器炎症疾患又は呼吸器過敏症の予防又は治療剤の投与量は、投与経路、症状、年齢、体重、予防又は治療剤の形態等によって異なるが、例えば、予防又は治療剤中の有効成分の量が、体重1kg当たり0.005~500mg, 好ましくは、0.1~100mg, 但し、成人に対して1日あたり、下限として0.01mg(好ましくは0.1mg), 上限として、20g(好ましくは2000mg, より好ましくは500mg, 更に好ましくは100mg)となるように、1回又は数回に分けて、症状に応じて投与することが望ましい。

**【0062】**

本発明の予防又は治療剤は、IL-18阻害剤、レドックス活性蛋白質、又はこれらをコードする遺伝子の中の一つを単独で用いる他、二種以上組み合わせて用いることができる。

**【0063】**

本発明の予防又は治療剤は、従来より知られている肺疾患の予防又は治療成分、あるいは、循環器疾患の予防又は治療成分との合剤としても良い。その予防又は治療成分としては、以下の1.~5.等が挙げられる。

## 【0064】

## 1. メディエーターアンタゴニスト:

例えば、LTB4 antagonists (例えばLY29311, SC-53228, CP-105,696, SB201146, BIIL284)、5'-Lipoxygenase inhibitors (例えばzileutin, Bayx1005)、Chemokine inhibitors、IL-8 antagonists (例えばSB225002; CXCR2 antagonists)、TNF inhibitors (例えばmonoclonal Ab, soluble receptors, MMP inhibitors)、Antioxydants (例えばNAC, NAL, グルタチオン, スーパーオキシドジスムターゼ等)、Prostanoid inhibitors (例えばCOX-2 inhibitors, thromboxane antagonists, isoprostane receptor antagonists)、iNOS inhibitor 等

## 【0065】

## 2. 抗炎症剤:

例えば、Phosphodiesterase 4 inhibitors (例えばSB207499, CP80633, CDP-840)、NF-kB inhibitors (例えばI-kB kinase inhibitors, Ikb $\alpha$  gene transfer)、Adhesion inhibitors (例えばanti-CD11/CD18, anti-ICAM1, E-selectin inhibitors)、Prostaglandin E analogs (例えばmisoprostil, butaprost)、サイトカイン (例えばIL-10)、p38 MAP kinase inhibitors (例えばSB203580, SB220025, RWJ67657)、Colchicine、Macrolide antibiotics (例えばerythromycin, clarithromycin, roxithromycin)等

## 【0066】

## 3. プロテアーゼインヒビター:

例えば、Neutrophil elastase inhibitors (例えばICI200355, ONO-5046, MR-889, L658, 758)、Cathepsin inhibitors (例えばsuramin)、Matrix metalloprotease inhibitors (例えばbatimastat, marimastat, KBR7785)、 $\alpha$ 1-antitrypsin (例えばpurified, human recombinant, gene transfer)、Secretory leukoprotease inhibitor、Elafin等

## 【0067】

## 4. Immunoregulators:

例えば免疫抑制剤FK506等

## 【0068】

## 5. 呼吸器炎症疾患又は呼吸器過敏症治療剤:

テオフィリン等のキサンチン誘導体、 $\beta$ 2受容体刺激剤、抗コリン剤、抗アレルギー用剤、副腎皮質ホルモン剤、吸入ステロイド等のステロイド剤等。

## 【0069】

また、本発明の予防又は治療剤は、その予防又は治療効果を阻害しない範囲で、他の成分を含有させることができ、例えば薬学的に許容される担体として、賦形剤、滑沢剤、結合剤、崩壊剤、安定剤、矯味矯臭剤、希釈剤、界面活性剤、乳化剤、可溶化剤、吸収促進剤、保湿剤、吸着剤、充填剤、増量剤、付湿剤、防腐剤等の添加剤を用いて周知の方法で製剤化することができる。

## 【0070】

ここに、賦形剤としては、有機系賦形剤及び無機系賦形剤等が挙げられる。

## 【0071】

本発明の予防又は治療剤は、主に経口投与するためのものであるが、具体的には、例えば錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、丸剤、トローチ、もしくはシロップ剤等の形態で、経口投与される。

## 【0072】

投与形態としては、経口投与のほか、静注等の静脈投与、筋肉内投与、経皮投与、皮内投与、皮下投与、腹腔内投与、直腸内投与、粘膜投与、吸入等が挙げられるが、静注等の静脈投与が安全かつ血中濃度を一定に保つという点で好ましい。

## 【0073】

尚、上述の、IL-18阻害剤やレドックス活性蛋白質をコードする遺伝子を、遺伝子療法における、予防・治療剤として用いることもできる。

## 【0074】

後述の実施例で示す通り、本発明の動物モデルによって、本来生体に発現しているIL-18を、組織特異的なプロモーターによって過剰に発現させると、肺疾患や循環器疾患を発症することが立証された。

一方、TRXは高く保存された活性部位(-Cys-Gly-Pro-Cys-)においてジチオール/ジルフイド交換反応による酸化還元活性を有する分子量約12kDのタンパク質である。我々は、すでにIL-18を過剰発現させたマウス間質性肺炎モデルにおいて、TRX投与により炎症細胞浸潤が抑制され間質性肺炎の抑制およびマウスの生存率の改善が認められるとのデータを得ている(特開2002-179588号)。

また最近の研究で、TRXが、マクロファージの酸化還元状態によってマクロファージからのIL-18やIFN- $\gamma$ の産生を抑制することも判明している(Murata Y, Ohteki T, Koyasu S, Hamuro J. IFN-gamma and pro-inflammatory cytokine production by antigen-presenting cells is dictated by intracellular thiol redox status regulated by oxygen tension. Eur J Immunol. 2002;32:2866-2873)。

#### 【0075】

従って、IL-18阻害剤だけでなく、TRX等のレドックス活性蛋白質も、グルタチオン、スーパーオキシドジスムターゼ等の抗酸化作用と同様、IL-18やIFN- $\gamma$ の産生抑制によって、COPD、間質性肺炎、肺胞蛋白症、循環不全(肝不全、心不全)の予防又は治療薬となりうることは、明らかである。

#### 【0076】

〈本発明の予防又は治療剤を用いた予防又は治療方法〉

本発明の予防又は治療剤を、上記のような様々な形態で投与すること、あるいは、本発明の予防又は治療剤である遺伝子を、遺伝子治療によって用いることによって、予防又は治療することができる。

#### 【実施例1】

#### 【0077】

肺に恒常的にIL-18を発現させた、実施例の動物モデルとして雄雌それぞれのSPC-IL-18TGマウスを多数作成した(血清中の成熟IL-18の発現量:ELISA分析で約1 ng/mL)。またコントロールとして、野生型のB6マウス3-5匹を用いた。実施例の動物モデルについて、2から24週齢の各週齢3-5匹ずつの肺組織を摘出し、HE染色による顕微鏡観察を行った。

#### 【0078】

SPC-IL-18TGマウスにおいて、間質部に著明な炎症細胞浸潤を伴った間質性肺炎、一部肺胞構造の破壊による肺気腫状の変化とヒト肺胞蛋白症に似た肺胞への著明な滲出物が病理学的に見られる(図3, 9週齢, HE染色 $\times 40$ 倍)。そして、この肺気腫状の変化は、両側全肺区域に亘る、びまん性のものであり、ヒト肺気腫により近いものであることが確認された。

尚、症状は、5週齢くらいから出始め、9週齢前後で、実施例で用いたほぼ全てのSPC-IL-18TGマウスにおいて、同様の病理像が見られ、個体差も少ないものであることが確認された。また、両側全肺区域に亘る、びまん性の肺気腫状の変化は、約5週齢と早期から出現していた。

一方、コントロールのマウスにはこれら間質性肺炎、一部肺気腫状の変化とヒト肺胞蛋白症に似た肺胞への滲出物は全く見られなかった(図4, 9週齢, HE染色 $\times 40$ 倍)。

#### 【0079】

これらのことから、実施例の動物モデルは、肺気腫に代表されるCOPD、間質性肺炎、肺胞蛋白症等の肺疾患の全てを早期に発症する肺疾患モデルとして、実用性に優れたものであることが分かった。

#### 【0080】

図5, 6は、各々図3, 4の拡大図である(9週齢, HE染色 $\times 100$ 倍)。

#### 【実施例2】

#### 【0081】

実施例 1 で用いた動物モデルの心臓組織を摘出し、H E 染色による顕微鏡観察を行った。SPC-IL-18TGマウスの心臓は著明な心室、心房の拡大、うっ血と心筋の肥厚が病理学的に見られる(図 7, 9 週齢, HE染色×40 倍)。

一方、コントロールのマウスにはこれら心室、心房の拡大、うっ血と心筋の肥厚は全く見られない(図 8, 9 週齢, HE染色×40 倍)。

#### 【0082】

これらのことから、実施例の動物モデルは、循環器疾患モデル、特に心不全等の循環不全動物モデルとしても有用であることが分かった。

#### 【実施例 3】

#### 【0083】

実施例 1 で用いた動物モデルの肝臓組織を摘出し、H E 染色による顕微鏡観察を行った。SPC-IL-18TGマウスの肝臓は著明なうっ血が病理学的に見られる(図 9, 9 週齢, HE染色×40 倍)。

一方、コントロールのマウスにはうっ血が見られない(図 10, 9 週齢, HE染色×40 倍)。

#### 【0084】

これらのことから、実施例の動物モデルは、循環器疾患モデル、特に肝不全等の循環不全動物モデルとしても有用であることが分かった。

#### 【0085】

また、このようにして得られた実施例の動物モデルの一例である SPC-IL-18TG マウスは、約 5-10 週以降、COPD、間質性肺炎、肺胞蛋白症、循環不全(肝不全、心不全)が、全て同時に発生することが、本発明者によって、初めて確認された。また、雄雌ともに、全例について、COPD、間質性肺炎、肺胞蛋白症、循環不全(肝不全、心不全)が確認された。従って、実施例の動物モデルが、生理活性物質 IL-18 を肺特異的に発現させるだけで、比較的早期に肺疾患のみならず、心臓、肝臓等における循環不全をも引き起こし、これらのいずれの動物モデルとしても使用し得るものであることが分かった。このことは、一種類の動物モデルの作成・管理のみで、複数のモデル使用が可能となることを意味し、莫大な費用・労力を必要とする疾病の動物モデルの維持・管理上、極めて有用なことである。

#### 【産業上の利用可能性】

#### 【0086】

また、本発明の COPD、間質性肺炎、肺胞蛋白症、循環不全(肝不全、心不全)の予防又は治療剤によって、呼吸器、循環器障害全般、これらの中でも、特に IL-18 の過剰発現に由来するものを、有効に治療・予防することができる。

#### 【0087】

更に、本発明のモデル動物によって、呼吸器、循環器障害の予防・治療剤のスクリーニングが可能となり、また被験物の呼吸器、循環器障害に与える影響を調べる(いわゆる二次スクリーニング)ことができる。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0088】

【図 1】 シグナルペプチドを持つ成熟 IL-18 cDNA のシーケンス (DNA 配列) である。

【図 2】 本発明で用いられる組換え遺伝子 SPC-IL-18SP である。

【図 3】 SPC-IL-18TG マウスの肺組織の病理像である (9 週齢, HE 染色×40 倍)。

【図 4】 野生型コントロールマウスの肺組織の像である (9 週齢, HE 染色×40 倍)。

。

【図 5】 図 3 の拡大図である (9 週齢, HE 染色×100 倍)。

【図 6】 図 4 の拡大図である (9 週齢, HE 染色×100 倍)。

【図 7】 SPC-IL-18TG マウスの心臓組織の病理像である (9 週齢, HE 染色×40 倍)。

。

【図 8】 野生型コントロールマウスの心臓組織の像である（9 週齢，HE 染色×4 0 倍）。

【図 9】 SPC-IL-18TGマウスの肝臓組織の病理像である（9 週齢，HE 染色×4 0 倍）。

【図 1 0】 野生型コントロールマウスの肝臓組織の像である（9 週齢，HE 染色×4 0 倍）。

## 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; KURUME UNIVERSITY

&lt;120&gt; spc-sig-IL-18

&lt;130&gt; P04AC002

&lt;160&gt; 2

&lt;170&gt; PatentIn version 3.2

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 546

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (70)..(540)

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Inventor: Hoshino, Tomoaki

&lt;400&gt; 1

ggaacaatgg agacagacac actcctgcta tgggtactgc tgctctgggt tccaggttcc 60

actggtgac aac ttt ggc cga ctt cac tgt aca acc gca gta ata cgg aat 111  
 Asn Phe Gly Arg Leu His Cys Thr Thr Ala Val Ile Arg Asn  
 1 5 10

ata aat gac caa gtt ctc ttc gtt gac aaa aga cag cct gtg ttc gag 159  
 Ile Asn Asp Gln Val Leu Phe Val Asp Lys Arg Gln Pro Val Phe Glu  
 15 20 25 30

gat atg act gat att gat caa agt gcc agt gaa ccc cag acc aga ctg 207  
 Asp Met Thr Asp Ile Asp Gln Ser Ala Ser Glu Pro Gln Thr Arg Leu  
 35 40 45

ata ata tac atg tac aaa gac agt gaa gta aga gga ctg gct gtg acc 255  
 Ile Ile Tyr Met Tyr Lys Asp Ser Glu Val Arg Gly Leu Ala Val Thr  
 50 55 60

ctc tct gtg aag gat agt aaa atg tct acc ctc tcc tgt aag aac aag 303  
 Leu Ser Val Lys Asp Ser Lys Met Ser Thr Leu Ser Cys Lys Asn Lys  
 65 70 75

atc att tcc ttt gag gaa atg gat cca cct gaa aat att gat gat ata 351



Ile Ile Ser Phe Glu Glu Met Asp Pro Pro Glu Asn Ile Asp Asp Ile  
80 85 90

caa agt gat ctc ata ttc ttt cag aaa cgt gtt cca gga cac aac aag 399  
Gln Ser Asp Leu Ile Phe Phe Gln Lys Arg Val Pro Gly His Asn Lys  
95 100 105 110

atg gag ttt gaa tct tca ctg tat gaa gga cac ttt ctt gct tgc caa 447  
Met Glu Phe Glu Ser Ser Leu Tyr Glu Gly His Phe Leu Ala Cys Gln  
115 120 125

aag gaa gat gat gct ttc aaa ctc att ctg aaa aaa aag gat gaa aat 495  
Lys Glu Asp Asp Ala Phe Lys Leu Ile Leu Lys Lys Lys Asp Glu Asn  
130 135 140

ggg gat aaa tct gta atg ttc act ctc act aac tta cat caa agt 540  
Gly Asp Lys Ser Val Met Phe Thr Leu Thr Asn Leu His Gln Ser  
145 150 155

taggtg 546

<210> 2  
<211> 157  
<212> PRT  
<213> Mouse

<400> 2

Asn Phe Gly Arg Leu His Cys Thr Thr Ala Val Ile Arg Asn Ile Asn  
1 5 10 15

Asp Gln Val Leu Phe Val Asp Lys Arg Gln Pro Val Phe Glu Asp Met  
20 25 30

Thr Asp Ile Asp Gln Ser Ala Ser Glu Pro Gln Thr Arg Leu Ile Ile  
35 40 45

Tyr Met Tyr Lys Asp Ser Glu Val Arg Gly Leu Ala Val Thr Leu Ser  
50 55 60

Val Lys Asp Ser Lys Met Ser Thr Leu Ser Cys Lys Asn Lys Ile Ile  
65 70 75 80

Ser Phe Glu Glu Met Asp Pro Pro Glu Asn Ile Asp Asp Ile Gln Ser

85

90

95

Asp Leu Ile Phe Phe Gln Lys Arg Val Pro Gly His Asn Lys Met Glu  
100 105 110

Phe Glu Ser Ser Leu Tyr Glu Gly His Phe Leu Ala Cys Gln Lys Glu  
115 120 125

Asp Asp Ala Phe Lys Leu Ile Leu Lys Lys Lys Asp Glu Asn Gly Asp  
130 135 140

Lys Ser Val Met Phe Thr Leu Thr Asn Leu His Gln Ser  
145 150 155

【書類名】 図面

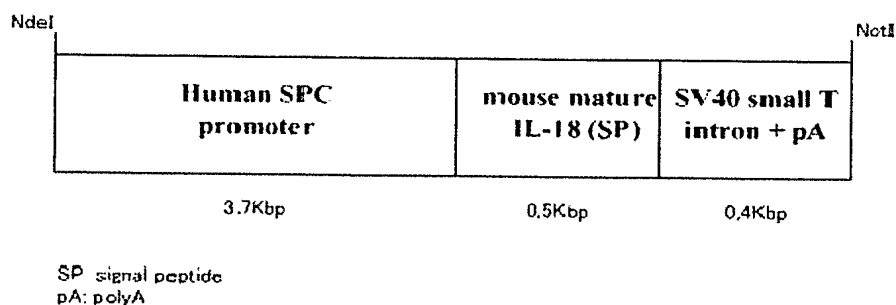
【図 1】

シグナルペプチドを持つマウス成熟 IL-18c DNA の塩基配列 (transgene)

1	GGACAATGG AGACAGACAC ACTCCTGCTA TGGGTACTGC TGCTCTGGGT	50
51	TCCAGGTTCC ACTGGTGACA ACTTTGGCCG ACTTCACTGT ACAACCGCAG	100
101	TAATACGGAA TATAATGAC CAAGTTCTCT TCGTTGACAA AAGACAGCCT	150
151	GTGTTGAGG ATATGACTGA TATTGATCAA AGTGCCAGTG AACCCGAGAC	200
201	CAGACTGATA ATATACATGT ACAAGGACAG TGAAGTAAGA GGACTGGCTG	250
251	TGACCTCTC TGTGAAGGAT AGTAAATGT CTACCTCTC CTGTAGAAC	300
301	AAGATCATT CCTTTGAGGA AATGGATCCA CTGAAAATA TTGATGATAT	350
351	ACAAAGTGAT CTCATATTCT TTCAGAAACG TGTTCCAGGA CACAACAAGA	400
401	TGGAGTTTGA ATCTTCACTG TATGAAGGAC ACTTTCTTGC TTGCCAAAAG	450
451	GAAGATGATG CTTTCAAAC CATTCTGAAA AAAAAGGATG AAAATGGGGA	500
501	TAAATCTGTA ATGTTCACTC TCACTAACTT ACATCAAGT TAGGTG	546

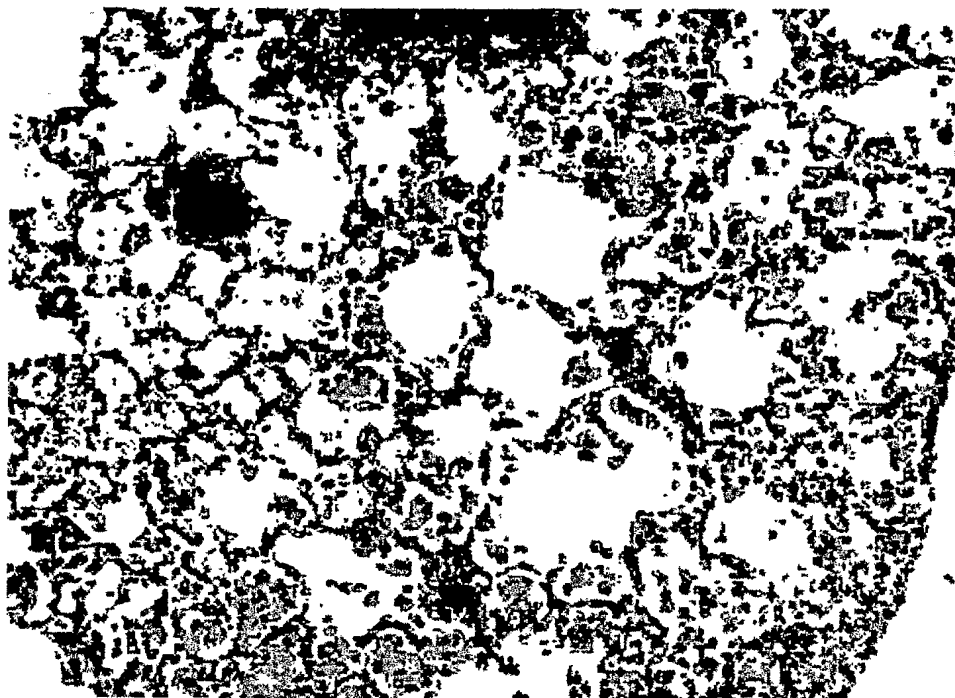
【図 2】

SPC-IL-18SP の構造図 (schematic design)



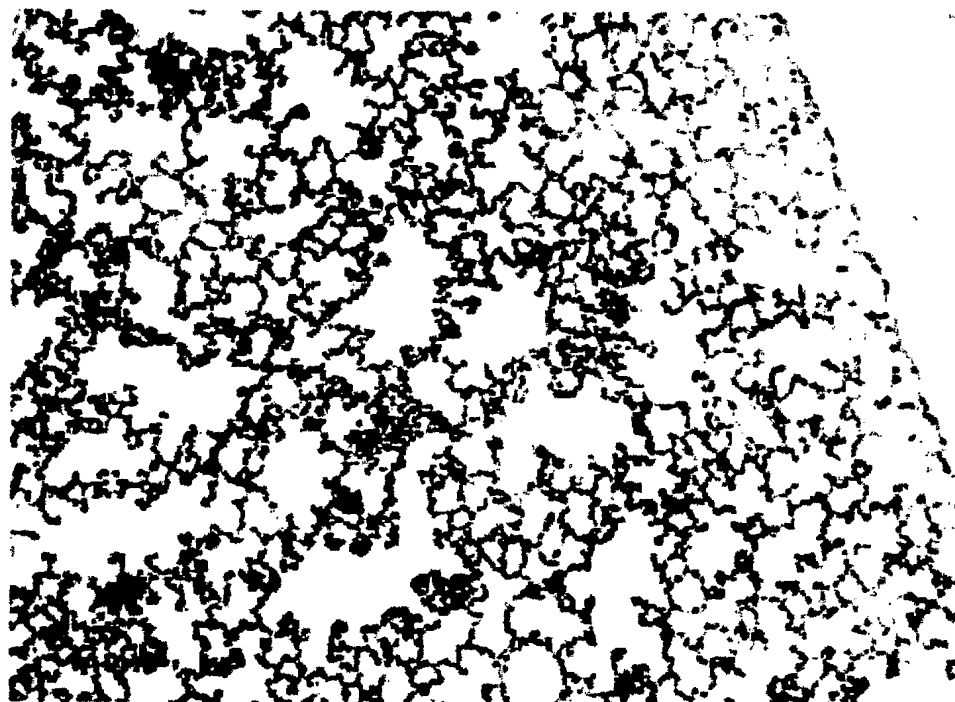
【図 3】

SPC-IL-18 TG mouse (9週齢)



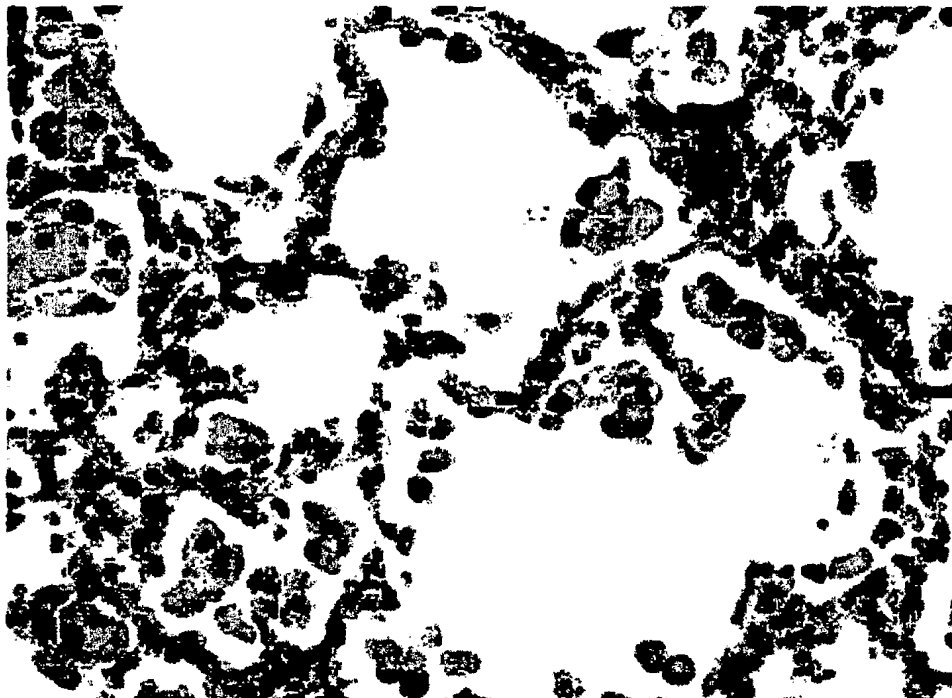
【図 4】

TG (-) control mouse (9週齢)



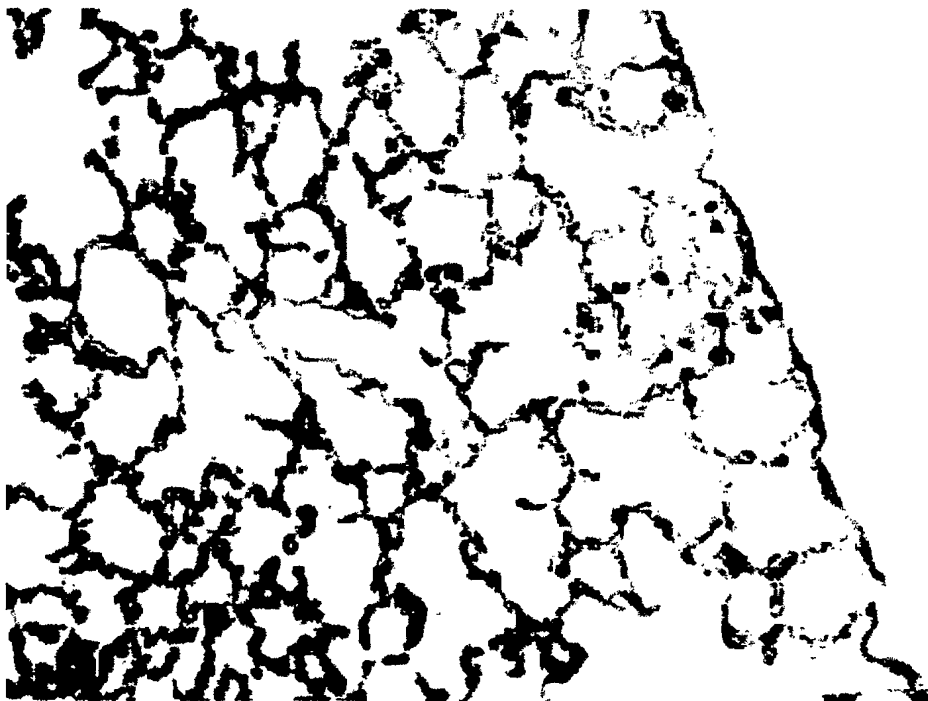
【図 5】

SPC-IL-18 TG mouse (9週齢)



【図 6】

TG (-) control mouse (9週齢)



【図 7】

SPC-IL-18 TG mouse (9週齢)



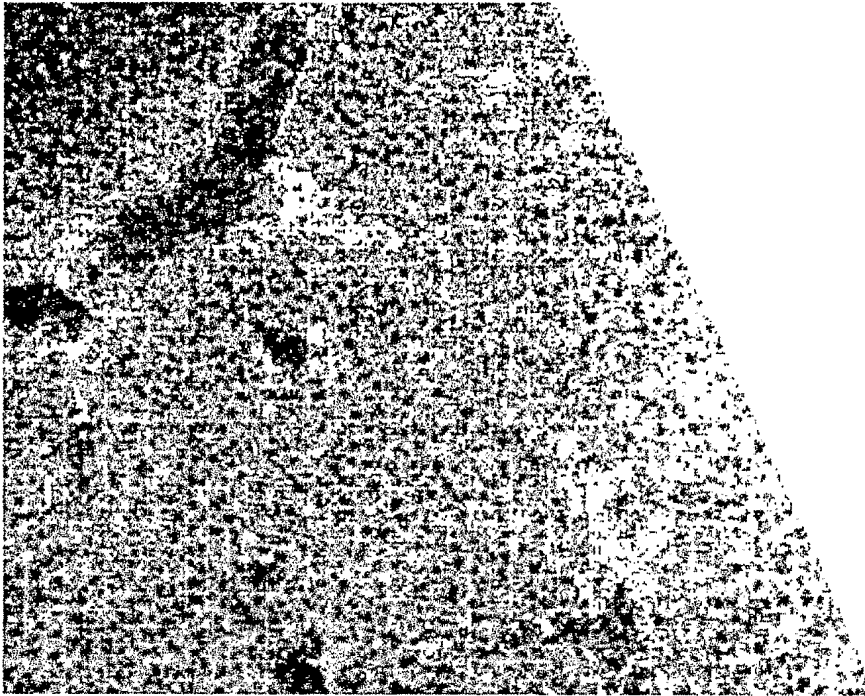
【図 8】

TG (-) control mouse (9週齢)



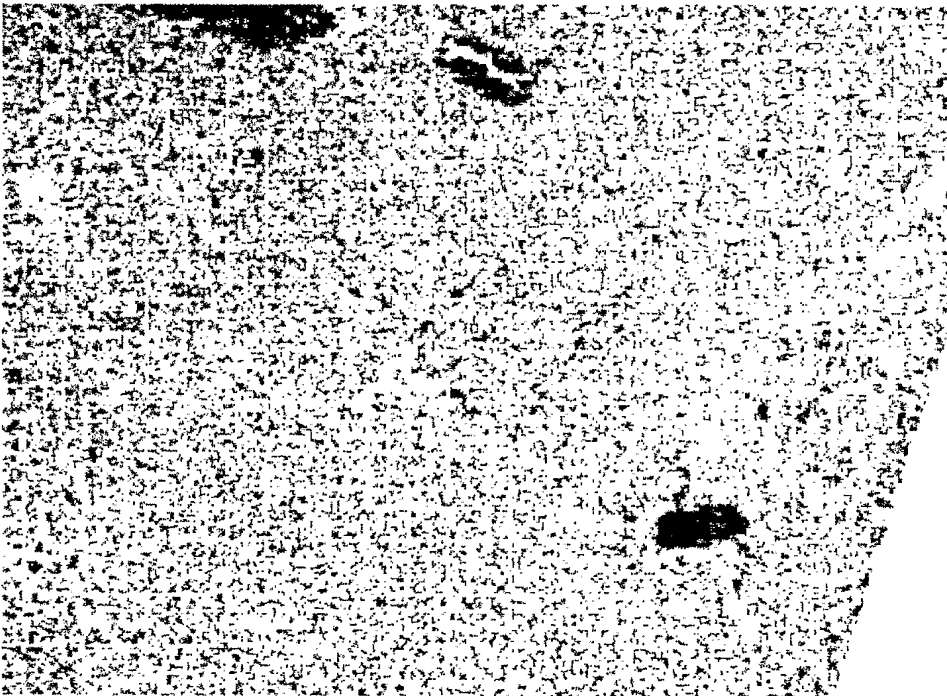
【図 9】

SPC-IL-18 TG mouse (9週齢)



【図 10】

TG (-) control mouse (9週齢)



## 【書類名】要約書

## 【要約】

【課題】 COPD、間質性肺炎、肺胞蛋白症等の肺疾患、循環不全（肝不全、心不全等）等の循環器疾患の、実用レベルに達した動物モデルを提供すること、及びその動物モデルを用いたこれら疾病の治療薬の評価方法を確立すること、更にはこの評価方法を用いて、これら疾病の治療薬を提供すること。

【解決手段】 肺特異的に発現するプロモーターの制御下にあるインターロイキン-18 遺伝子を含むことを特徴とする組換遺伝子、当該組換遺伝子を導入した疾患動物モデル、当該動物モデルを用いることを特徴とする、被験物の疾患に与える影響を評価する方法、疾患の予防又は治療剤である。

【選択図】 図 2



認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2 0 0 4 - 0 6 9 8 3 5
受付番号	5 0 4 0 0 4 0 5 7 7 8
書類名	特許願
担当官	第二担当上席 0 0 9 1
作成日	平成 1 6 年 3 月 1 7 日

< 認定情報・付加情報 >

【提出日】 平成16年 3月11日

特願 2 0 0 4 - 0 6 9 8 3 5

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 5 9 9 0 4 5 9 0 3 ]

1. 変更年月日

1 9 9 9 年 3 月 2 9 日

[変更理由]

新規登録

住 所

福岡県久留米市旭町 6 7 番地

氏 名

学校法人 久留米大学